中華農業研究（Jour. Agric. Res. China）48(2)：67～85（1999）

台灣落花生種原親緣關係之研究 Ⅱ.應用 RAPD 進行落花生種原親緣關係之研究[1]

范明仁[2] 羅舜芳[2] 王昭月[2] 許庭榮[2]
曹文隆[3] 楊金興[3] 鄭耀星[4]

摘要：本試驗使用本省過去落花生育種上常用之親本及重要育成品種(系)共 30 種，探討利用逢機增殖多型性DNA (RAPD) 標誌進行親緣關係之判別，並與農藝性狀之結果相互比較，期由歐氏距離做為將來育種材料選定之參考，以提昇育種效率，並希望能發展出落花生種原判別鑑定之方法。由RAPD試驗結果得知，以Operon 200 個引子經篩選後得 11 個具有多型性的引子(佔 5.5%)，共有 212 條多型性片段，其中OPE13、OPF16 及OPJ 17 三個引子所產生之多型性片段具有與品種特性有關之分子標誌，分別位於 699 bp、337 bp 及 640 bp 處；此三個分子標誌可作為 Spanish、Valencia 及 Virginia 三種植物型態之分辨用。另將具多型性之 11 個引子，其 RAPD 電泳圖譜進行未加權算術平均法 (Unweighted Pair-Grouping Mean Arithmetical；UPGMA) 之綜合集群分析以求得樹狀圖；再以集群分析之兩群間最小距離(MD)、複相關係數(RSQ)和標準偏差(RMSSTD)等三項統計值來做為判斷集群分群個數的依據。當歐氏距離大於 0.83 時可分為七個族群，第一群為 Spanish 型之老公仔豆、台南七號及台南選九號；第二群為 Valencia 型之 PI314817；第三群為台南十一號育種系統、台農四號育種系統及台南十二號共 9 品系；第四群均為本地在來種但未運用在育種系統所用之 Virginia 型 4 品系；第五群為本地種中 Spanish 型之台南白油豆二號；第六群均為本地種及引進種中之 Spanish 型共 6 品系；第七群為臺農五號育種系統及 Florispan runner 共 6 品系。由此結果可以清楚得知台南十一號育種系統、台農四號育種系統及臺農五號育種系統之譜系關係，與由 RAPD 所得資料經集群分析結果之分群結果頗為符合，並與植物型分類結果相符合；依上述結果推論，落花生種原若使用本試驗所得之引子進行歐式距離分析以及親緣關係之探討，應屬相當可行。

關鍵詞：逢機增殖多型性 DNA、群集分析、落花生。

前　言

落花生(*Arachis hypogaea* L.) 種子含粗蛋白 22～30%及油分 44～56%，組成份佳，且適口性及續食性高又具有獨特芳香[(4)]，加上其耐旱性及耐瘠性之特性，故其用途甚廣，為世界上重要的經濟作物，亦為臺灣的主要雜糧作物之一；目前臺灣種植面積約為 3 萬 5 千公頃，產量 8 萬餘公噸[(5)]，亦為我國

1. 臺灣省農業試驗所　研究報告第 1976 號。
2. 本所作物種原室研究員兼主任、約聘助理、助理研究員、約聘助理。臺灣省　臺中縣　霧峰鄉。
3. 本所農藝系助理研究員。臺灣省　臺中縣　霧峰鄉。
4. 行政院農業委員會農糧處農產科技正。臺北市。

爲因應加入 WTO 後之重點發展產業作物之一。本省落花生目前雖單位面積產量及品質大幅提高，但卻因競爭作物大量廉價進口，油用消耗量減少，生產成本高漲，而喪失競爭力。將來貿易自由化後，本省落花生產業，首務爲創造新風味、口感的品種並大幅降低生產成本，提高單位面積產量及品質，及以機械化作業取代人工，再配合落花生產品加工利用之多樣化，尤其是大粒鮮莢果加工產品之開發，才能提昇省產落花生之競爭力，而此有待加強落花生品種改良，栽培改進，以及加強產銷及加工利用方面之研究。

植物育種專利(Plant Breeder's Right, PBR) 推行以來，品種鑑定已日益凸顯重要性。品種鑑定方法早期大多利用植株外表型態的觀察[19,26]，然而由外表型態進行品種鑑定耗時且易受環境因子影響[28]；而無法達到完全鑑定區別的目的。

近年來已可利用分子生物技術，直接由DNA序列上的差異來進行品種鑑定，一般而言DNA序列不受生理及環境因子之影響，且所代表的遺傳資訊更多，用於種原鑑別上更爲精準及高效率。目前較常用之技術爲限制酵素切割片段長度多型性(Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP)、逢機增殖多型性 DNA 標誌 (Randomly Amplified Polymorphic DNA, RAPD) 及增殖片段長度多型性 (Amplified Fragment Length Polymorphism, AFLP)。其中 1980 年由 Botstein[8]等人提出之 RFLP，及 Vos[45]等人於 1995 年應用 RFLP 與 RAPD 的原理所提出之 AFLP 之方法，由於經過限制酵素切割，可得到大量具有樣品獨特差異之專一性片段，且產生之條帶多達 30-50 條，故所獲得之分子標誌比 RAPD 多，再現性亦穩定，極適合進行大規模樣品分析，RFLP 及 AFLP 方法於品種鑑定上均具有高度正確性及信賴度；唯試驗操作上技術性高且繁瑣，常須使用放射性物質，其中 RFLP 並須取得 DNA 序列組合之相關資料，試驗流程耗時極長，且所須之植物體之 DNA 量較 RAPD 多[43]；因而在種原鑑定上，RAPD 一般被認爲具有快速、準確之優點而較常使用。

目前逢機增殖多型性 DNA 標誌應用於分析植物基因上之研究報導甚多，包括有：特定基因之分析[12,31]、營養繁殖體基因特性與變異之分析[9,24]、種間基因分析與鑑定[11,36,47,50]、栽培品種鑑定與分類[41,46,48,49]、作物親緣關係之研究[23,29,33]。而近幾年間已有水稻、小麥、十字花科蔬菜、馬鈴薯、櫻桃、豆科等多數作物的種原鑑別或基因分析研究報告提出[6,7,10,13,14,25,32.38,42,44]。

落花生種原利用同功異構酵素[30,40]及種子蛋白質圖譜[39]鑑別時，可供判別之差異性極小。Halward 等人[14,17]曾於 1991 及 1992 年時以 RAPD 分子標誌技術探討美國野生種及栽培種落花生的遺傳變異及親緣關係。由 RAPD 之電泳結果上顯示在栽培種中呈現低度之遺傳變異性；野生種則具有較高之遺傳變異，而 Kochert 等[21,27,37]學者以 RAPD 及 RFLP 鑑別落花生野生種及栽培種之種原時亦有相同之結果。1997 年 He 等[20]以野生種 *A. duranensis* 之 RAPD 圖譜集群分析結果發現與地域分佈關係相符合。1995 年 Garcia 等[13,14]利用 RAPD 分子標誌來鑑定落花生種原及特殊性狀基因之篩選，其結果亦認爲栽培種落花生遺傳歧異度低。因此，利用 RAPD 技術鑑定，在技術上仍需進一步研究探討。

應用農藝性狀雖可將這些品種做初步之判別，但鑑於栽培種落花生遺傳歧異度低，且農藝性狀常受環境之影響而無法表現出原有之性狀，如 Virginia 型之大粒種在本省之環境下常無法表現，另育種過程上常於 Spanish 型導入 Virginia 型，如此更增加判別上之困難；有鑑於此，乃嘗試以 RAPD 分子標誌，並以較大量之引子篩選，期能於 DNA 分子層次上探討本省落花生種原之親緣關係及種原鑑定之判定。

故本試驗以台灣過去落花生育種上主要的材料及育成之重要品種爲材料，應用逢機增殖多型性 DNA 標誌(RAPD markers)技術，進行親緣關係之鑑定，並與農藝性狀之統計分析結果相互比較。以期瞭解臺灣落花生種原的親緣關係，並做爲將來育種材料選定之參考，以提昇育種效率；同時，亦希望能發展出落花生種原判別鑑定之方法，以爲國家作物種原中心區別與鑑定落花生種

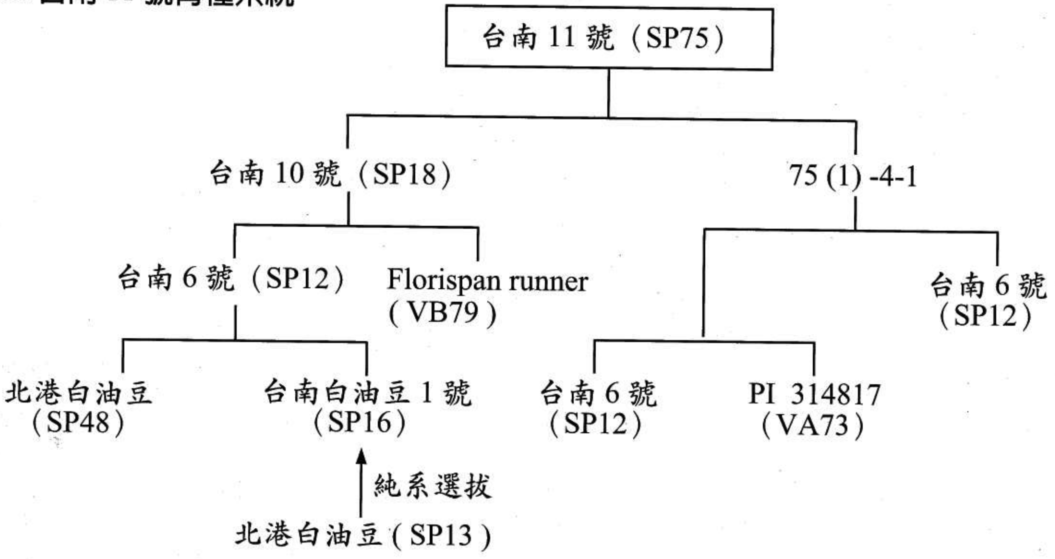
原之利用。

材料及方法

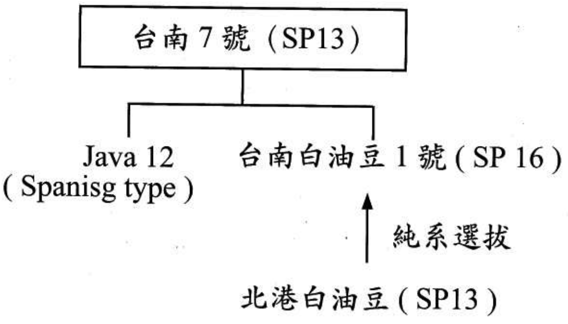
一、試驗材料

本試驗以本省過去落花生育種上常用之親本及育成之重要品種(系) 30 種，做爲供試材料。依其育種譜系關係分成七大群(圖 1)，包括台南白油豆一號、台南白油豆二號、台南六號、台南七號、台南選九號、台南十號、台南十一號、台南十二號、北港白油豆、PI314817、Florispan runner、台農一號、台農二號、台農三號、台農四號、台農五號、Kinorales、Spanish white、CJ444、Chiba bunch、Java2、Spanish small、懷遠種、金門種、Imp. sp. 2-B-48-1、澎湖二號、鴛鴦豆、老公仔豆、立枝仔及大冇。栽培種落花生依其植物型可分成Spanish型、Valencia 型、Virginia bunch 型、Virginia runner 型等四型，本試驗供試品系中 Spanish 型有 22 個品種(系)，Virginia runner 型有 3 個品種(系)，Virginia bunch 型有 3 個品種(系)及 Valencia 型有 2 個品種(系)；供試的 30 個品種(系)之落花生名稱、縮寫代號、RAPD 電泳圖譜代號、植物分類學所屬亞種及變種學名詳如表 1。

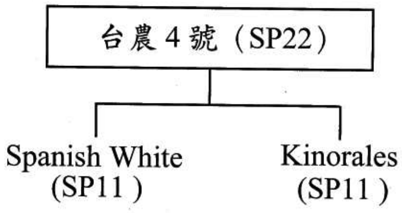
A. 台南 11 號育種系統



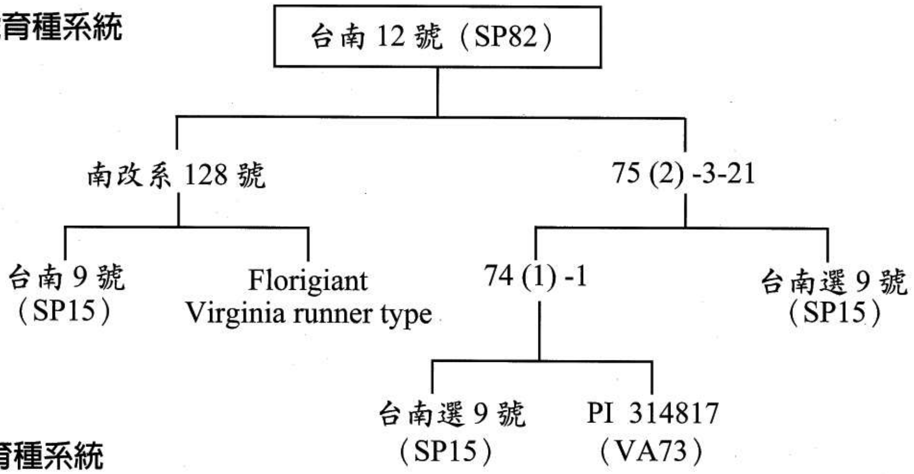
B. 台南 7 號育種系統



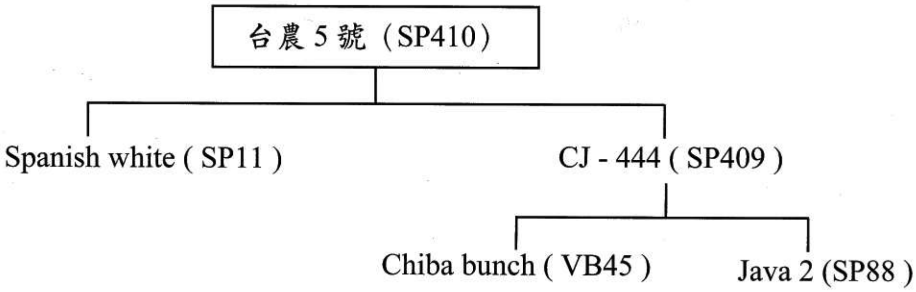
C. 台農 4 號育種系統



D. **台南 12 號育種系統**



E. **台農 5 號育種系統**



F. **本地種選育群**

4. 澎湖 2 號**(VR17)** ← 純系選拔 ← 鴛鴦豆**(VR20)**

5. 台南白油豆 1 號**(SP16)** ← 純系選拔 ← 北港白油豆**(SP48)**

6. 台南白油豆 2 號**(SP17)** ← 純系選拔 ← 善化白油豆

7. 台農 1 號**(SP19)** ← 純系選拔 ← 懷遠種花生**(SP60)**

8. 台農 2 號**(SP20)** ← 純系選拔 ← 金門種花生**(SP62)**

G. **國外引進種選育群**

1. 台農 3 號 **(SP21)** ← 純系選拔 ← **Imp. sp. 2-B-48-1 (SP216)** ← 純系選拔 ← **Imp. Spanish** (美國引進)

2. **Spanish white (SP11)** (美國引進)
3. **Spanish small (SP325)** (美國引進)
4. **Florispan runner (VB79)** (美國佛羅里達州引進)
5. **PI 314817 (VA73)** (美國引進)
6. 台南選 9 號 **(SP15)** ←純系選拔— **Giay** (越南永隆省引進)
7. **Kinorales (VA12)** (越南引進)
8. **Java 2 (SP88)** (印尼爪哇引進)
9. **Chiba bunch (VB45)** (日本引進)
10. **CJ-444 (SP409)** — **Chiba bunch (VB45)** (日本引進) / **Java 2 (SP88)** (印尼爪哇引進)

圖 1. 三十個品種（系）落花生育種譜系圖。

Fig.1. Pedigree maps of breeding systems of 30 peanut varieties.

表 1. 供試落花生(*A. hypogaea*)之品種(系)名稱、RAPD 代號、植物型以及依分類學所屬之亞種及變種學名

Table 1. RAPD code, cultivar name, variety code, plant botanical type and scientific name of subspecies and variety of peanuts used for RAPD analysis

RAPD code	Cultivar name	Variety code	Plant botanical type	Scientific name	
				Subspecie	variety
1	Florispan runner	VB79	Virginia bunch	*Hypogaea*	*hypogaea*
2	臺南白油豆二號	SP17	Spanish	*Fastigiata*	*vulgaris*
3	臺南十號	SP18	Spanish	*Fastigiata*	*vulgaris*
4	臺南六號	SP12	Spanish	*Fastigiata*	*vulgaris*
5	臺南十一號	SP75	Spanish	*Fastigiata*	*vulgaris*
6	PI 314817	VA73	Valencia	*Fastigiata*	*fastigiata*
7	北港白油豆	SP48	Spanish	*Fastigiata*	*vulgaris*
8	臺南白油豆一號	SP16	Spanish	*Fastigiata*	*vulgaris*
9	臺農四號	SP22	Spanish	*Fastigiata*	*vulgaris*
10	Spanish small	SP325	Spanish	*Fastigiata*	*vulgaris*
11	Kinorales	VA12	Valencia	*Fastigiata*	*fastigiata*
12	臺南七號	SP13	Spanish	*Fastigiata*	*vulgaris*
13	臺南選九號	SP15	Spanish	*Fastigiata*	*vulgaris*
14	老公仔豆	SP46	Spanish	*Fastigiata*	*vulgaris*
15	臺南十二號	SP82	Spanish	*Fastigiata*	*vulgaris*
16	Chiba bunch	VB45	Virginia bunch	*Hypogaea*	*hypogaea*
17	Java 2	SP88	Spanish	*Fastigiata*	*vulgaris*
18	CJ-444	SP409	Spanish	*Fastigiata*	*vulgaris*
19	Spanish white	SP11	Spanish	*Fastigiata*	*vulgaris*
20	臺農五號	SP410	Spanish	*Fastigiata*	*vulgaris*
21	臺農一號	SP19	Spanish	*Fastigiata*	*vulgaris*
22	懷遠花生	SP60	Spanish	*Fastigiata*	*vulgaris*
23	臺農二號	SP20	Spanish	*Fastigiata*	*vulgaris*
24	金門種	SP62	Spanish	*Fastigiata*	*vulgaris*
25	臺農三號	SP21	Spanish	*Fastigiata*	*vulgaris*
26	Imp. sp. 2-B-48-1	SP216	Spanish	*Fastigiata*	*vulgaris*
27	澎湖二號	VR17	Virginia runner	*Hypogaea*	*hypogaea*
28	大冇	VR19	Virginia runner	*Hypogaea*	*hypogaea*
29	立枝仔	VB12	Virginia runner	*Hypogaea*	*hypogaea*
30	鴛鴦豆	VR20	Virginia runner	*Hypogaea*	*hypogaea*

二、試驗方法

(一) 落花生總 DNA 之萃取：

依試驗材料將 30 品種(系)落花生種子經置床發芽一週後，取幼苗之下胚軸 (0.5 g)，用液態氮冰凍後，磨成粉狀放入 45ml 離心管，加入 30μl RNase (5 mg/ml) 及 15 ml 萃取緩衝液[14.25 ml TNE buffer pH 8.0 (500 mM NaCl；100 mM Tris base；50 mM EDTA disodium)；1% SDS (sodium dodecylsulfate)；0.2% 2-mercaptoethanol] 混勻後，置於 65℃ 水浴 10 分鐘，輕輕混勻。再加入 4 ml 之 5M potassium acetate 混合均勻後置於冰上 20 分鐘。於 4℃，15,000 rpm 離心 (BECKMAN J2-MC，rotor 8256) 15 分鐘，再以 Miracloth (CALBIOCHEM®) 過濾；將上清液加入等體積之 phenol/chloroform/isoamylalcohol (25:24:1) 15 ml 振盪 30 秒，於室溫中以 12,000 rpm 離心 10 分鐘，取上層液加入等體積之 isopropyl alcohol 置室溫中 30 分鐘使 DNA 沉澱。再以 12,000 rpm 離心 15 分鐘，倒掉上清液，將沉澱物以冷凍乾燥濃縮離心機 (Jouan RC 10.10)乾燥之，以 0.5 ml TE 緩衝液 (10 mM Tris-HCl，pH 8.0；1 mM EDTA，pH 8.0) 溶解 DNA 沉澱物，並稀釋 100 倍以分光光譜儀 (HITACHI U-3000)測定 260 nm 之吸收值，再換算成 DNA 濃度。將 DNA 濃度稀釋成 5 ng/μl，貯存於 -20℃中，做爲聚合酵素連鎖反應 (Polymerase Chain Reaction；PCR) 之模版 DNA。

(二) 隨意引子聚合酵素連鎖反應 (Arbitrary Primer Polymerase Chain Reaction；AP-PCR)：

1. 聚合酵素連鎖反應液：

將上述稀釋過之 DNA 爲模板，引子爲購自 Operon Technologies 公司之 10 個核甘酸序列的隨意引子，OPA、OPB、OPC、OPD、OPE、OPF、OPG、OPH、OPI 及 OPJ 等十組，每組各 20 個，共 200 個。

反應溶液參考 Oard 和 Dronavalli (1992)[35]，反應液總體積爲 25μl。於 0.5 ml 微量尖底離心管內加入 1 unit Taq polymerase (Promega)，1 X PCR buffer (50 mM KCl，10 mM Tris-HCl pH 9.0，0.1% Triton®X-100)(Promega)，2.5 mM $MgCl_2$，200μM dNTP，0.2μM primer 及 25 ng template DNA，上面覆蓋 30μl 之 minerol oil，以聚合酵素連鎖反應器(Perkin Elmer DNA Thermal Cycler 480)進行反應。反應溫度條件設定如下：第 1 次循環：94℃ 3 分鐘後降至 37℃ 1 分鐘，再升溫至 72℃ 1 分鐘；再以 94℃ 1 分鐘，37℃ 1 分鐘，72℃ 2 分鐘進行 44 個循環。整個反應流程約須 5 小時。反應結束後取出，保存於 -20℃冰箱中，以備電泳。

2. 電泳及影像儲存：

取 15μl 之聚合酵素連鎖反應增殖 DNA，加入 6 倍的電泳緩衝液 (6 X loading buffer：0.25% bromophenol blue，0.25% xylene cyanol 及 40% W/V sucrose)，以 2% agarose gel 在 TAE buffer (40 mM Tris-acetate，pH 8.0；1 mM EDTA)中進行電泳。核甘酸分子量標示係採用ϕ×174 RF DNA/*Hae*Ⅲ (BioLabs)爲標示，以計算 DNA 條帶之分子量。電泳槽係採用 Cosmo Bio. Lo .,LTD., Mupid-2，電壓爲 110 伏特，電泳後約 30 分鐘後將膠片置於 0.5 mg/ml ethidium bromide 中染色約 5-10 分鐘，以紫外線呈像後以 Alpha Innotech Corporation IS-500 Gel Documentation System 之膠體影像處理系統照相並儲存影像。

3. 資料分析：

將儲存之影像經影像分析軟體(GelCompar™，Applied Meth BVBA)求得數位化之數據，以 Mumm 等[34]發表之方法，利用 PC-SAS 電腦程式分別依據 Dice's coefficient [$2N_{AB}/(N_A+N_B)$；N_{AB}：A 樣品及 B 樣品相同之條帶數，N_A：A 樣品條帶總數，N_B：B 樣品條帶總數]或 Jaccard's coefficient [$N_{AB}/(N_A+N_B-N_{AB})$]爲基礎計算歐式距離矩陣 (matrix for Euclidean distances)及相異距離矩陣(Dissimilarity matrix)，再以未加權算術平均法(Unweighted Pair-Grouping Mean Arithmetical；UPGMA)之集群(cluster)分析，建立其樹狀圖(dandrogram)及求得相異距離

(Dissimilarity distance)，並以集群分析中所得到 29 個集群的標準化之最小距離(mini distance；MD)、複相關係數(RSQ)和所有變數之標準偏差(RMSSTD)等三項統計值來做爲判斷集群個數的依據(1)。

結　果

本試驗以 200 個引子(Operon Technologies, Inc, Alameda, Calif. OPA-OPJ)，經 RAPD 分析結果，篩得具有多型性且再現性良好的引子 11 個，比率數爲 5.5%；而其中之 OPF16、OPE13 及 OPJ17 三個引子所產生之三個多型性片段(OPE13-699 bp;OPF16-337 bp；OPJ17-640 bp) 之存在與否與落花生之植物型態的特徵呈相關特性 (表 2)。以 OPF16 而言，在 337 bp 有一標誌條帶(OPF16-337 bp)，爲 Valencia 型及 Virginia 型所特有，但 Spanish 型則全部沒有(圖 2B)。Valencia 型及 Spanish 型中除了 CJ-444 (SP409，RAPD code 18)外，使用 OPE13 引子在 699 bp 處均有一標誌條帶(OPE13-699 bp)，而 Virginia bunch 型及 CJ-444 (SP409，RAPD code 18)皆缺失此條帶(圖 2A)。由 OPJ17 引子所得之結果顯示在 640 bp 處有一個標誌條帶(OPJ17-640)，CJ-444 與 Virginia bunch 、Virginia runner 型，均具有此條帶，而 Kinorales (VA12，RAPD code 11) 及 CJ-444 外之其餘 Spanish 型品系均無此條帶，此結果亦與 OPE13 之結果相似(圖 2C)。由 RAPD 電泳之結果與植物型分類相比對(表 3)，引子 OPE13 所產生之 699 bp 條帶，可爲區分 Virginia 型與 Spanish 型、Valencia 型之標誌條帶；另外，引子 OPF16 所產生之 337 bp 之條帶可區分出 Spanish 型與 Valencia 型、Virginia 型，而引子 OPJ17 所產生之 640 bp 條帶，可做爲 Spanish 型與 Valencia 型、Virginia 型之植物型態分群時之輔助標誌；綜合上述，以此三個標誌條帶可清楚做爲鑑別 Virginia 型、Valencia 型與 Spanish 型等三種植物型態之分子標誌條帶。

表 2. DNA 標誌條帶在三十個落花生品系出現之情形

Table 2. Appearance of DNA marker bands within 30 varieties of peanut

Primer	Product size	VB79	SP17	SP18	SP12	SP75	VA73	SP48	SP16	SP22	SP325	VA12	SP13	SP15	SP46	SP82
OPE13	699bp	−[z]	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
OPF16	337bp	+	−	−	−	−	+	−	−	−	−	+	−	−	−	−
OPJ17	640bp	+	−	−	−	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−

Primer	Product size	VB45	SP88	SP409	SP11	SP410	SP19	SP60	SP20	SP62	SP21	SP216	VR17	VR19	VB12	VR20
OPE13	699bp	−	+	−	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−	−	−
OPF16	337bp	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+	+	+	+
OPJ17	640bp	+	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	+	+	+	+

z +: band is present; −: band is absent.

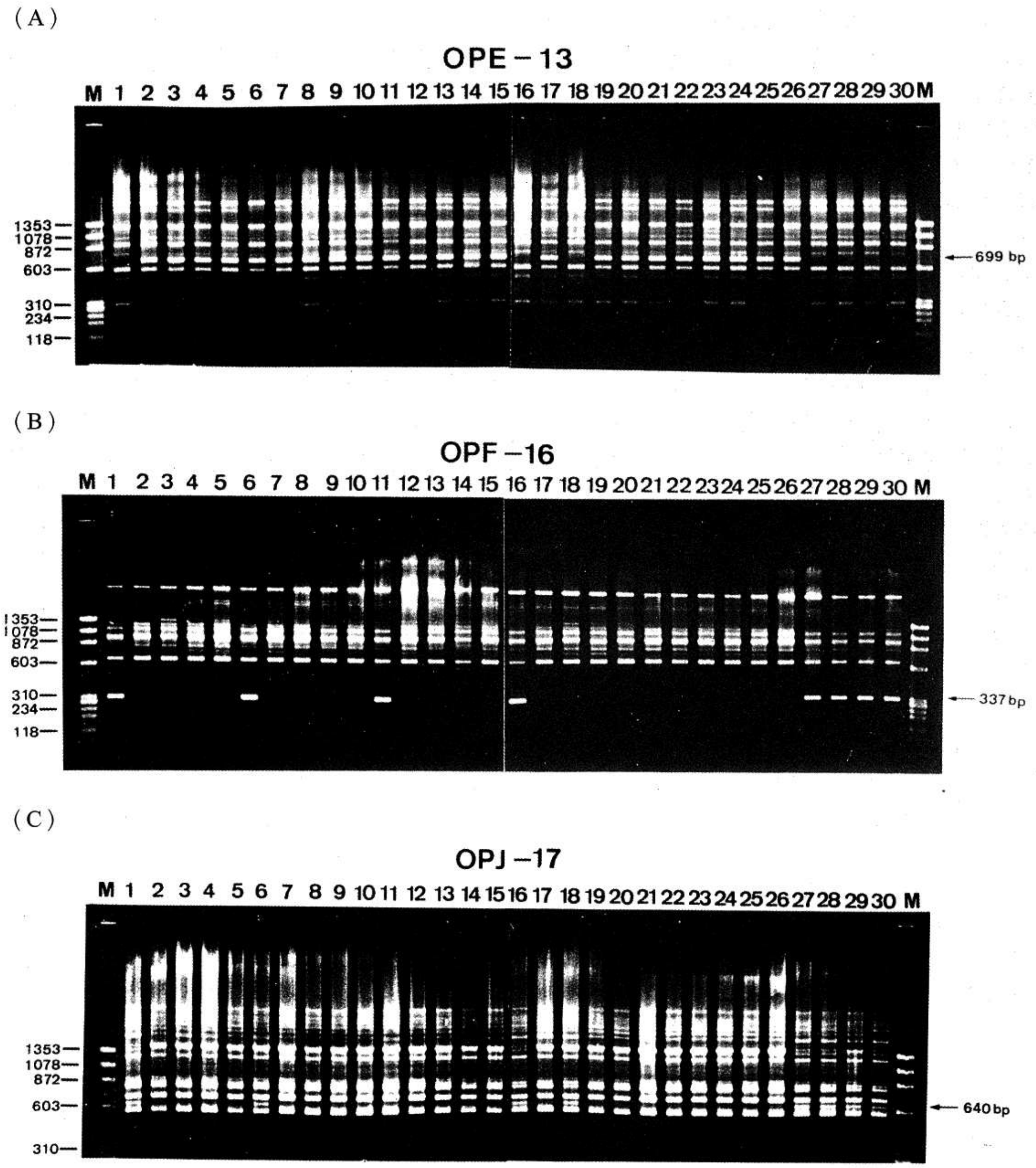


圖 2. 落花生三十個品種(系)應用RAPD所得之電泳圖譜可獲得因植物型分類之標誌條帶；(A)以OPE13 爲引子：Valencia 型及 Spanish 型在 699 bp 處均有一明顯之 marker band，而 Virginia 型及 SP409 則無此條帶；(B)以 OPF16 爲引子：Valencia 型及 Virginia 型在 337 bp 處均有一明顯之 marker band，而 Spanish 型則無此條帶；(C) 以 OPJ17 爲引子：Virginia 型、VA73 及 SP409 在 640 bp 處均有一明顯之 marker band，而 Spanish 型及 VA12 則無此條帶。M 爲ϕ×174 RF DNA/*Hae*Ⅲ Digest ；各樣品代號如表 1。

Fig. 2. RAPD profiles which has RAPD markers within the 30 varieties (lines) of peanut. (A) Generated by primer OPE13: Valencia type and Spanish type have a significantly marker band in 699 bp, but Virginia type and SP409 not. (B) Generated by primer OPF16: Valencia type and Virginia type have a significantly marker band in 337 bp, but Spanish type not. (C) Generated by primer OPJ17: Virginia type, VA73 and SP409 have a significantly marker band in 640 bp, but Spanish type and VA12 not. M: DNA markers, ϕ×174RF DNA/*Hae*Ⅲ digest; numbers on the top are the RAPD code listed in Table 1.

將 OPB2、OPB14、OPE13、OPF15、OPF16、OPF18、OPF19、OPG12、OPH9、OPH11 及 OPJ17 等 11 個引子進行 RAPD 反應，共得到 212 個多型性條帶，平均每個引子可產生 19 個多型性條帶，以 Dice's coefficient 計算得之歐氏距離介於 0.34 與 0.71 之間，而以 Jaccard's coefficient 計算得之歐氏距離介於 0.45 與 0.82 之間；其中最小距離存在於台南白油豆一號(SP16)與台農四號(SP22)之間，而最大距離存在於台南七號 (SP13) 與 Chiba bunch (VB45)之間。再以 PC-SAS 軟體計算 Dice's coefficient 及 Jaccard's coefficient 方法的相異距離矩陣(Dissimilarity distance matrix)，並以此一相異距離矩陣進而做集群分析，由其結果發現 Dice's coefficient 及 Jaccard's coefficient 相異距離矩陣結果相似。因此，本研究僅以 Dice's coefficient 之相異距離矩陣結果加以討論；Dice's coefficient 相異距離矩陣經由集群分析後可得到 29 個集群的標準化之兩群間最小距離(MD)、複相關係數(RSQ)和所有變數之標準偏差 (RMSSTD) (表 4)等三項統計值來做爲判斷集群個數的依據。由標準化的兩群間最小距離(MD)資料得知，一開始的下降變化很大而在第 2 群(0.956)後的變化幅度開始減緩，至第 7 群 (0.825) 時其後任意二群間的 MD 變化程度均很小，顯示群間差異小於群內，故在第 7 群後不再分群。其次，以複相關係數(RSQ)得知，一開始的上昇變化很大而在第 2 群(0.292)後的變化幅度開始減緩，至第 7 群(0.545)時其後任意二群間的 RSQ 變化程度均很小，故亦應以 7 個集群的區分等級來做分群的標準。最後，以所有變數之標準偏差(RMSSTD)之資料亦可知，一開始的下降變化亦很大而在第 2 群(0.110)至第 4 群(0.104)、第 4 群(0.104)至第 6 群(0.102)以及第 6 群 (0.102) 至第 8 群 (0.099)間的升降變化均開始減小，而後其它任意二群間的 RMSSTD 開始減小的變化程度均較小且不合適，故可知以 3 個集群、5 個集群和 7 個集群等三種集群區分等級來做分群的標準是較爲理想。但是，若將 RMSSTD 的分群結果和 MD、RSQ 來做比較，同時並考慮到 30 種落花生品種(系)所區分的五組育種系統或二類選育群，本文則僅採用 3 個集群和 7 個集群等二種集群區分等級來分析；基本上由 MD、RMSSTD 及 RSQ 之資料，可知本試驗之結果可以分成 7 個集群，而不宜再細分下去。另外，在僅分成 3 個集群時，可以與植物型之判別做一比對，故亦深具意義。

以其兩群間最小距離 (MD) 大於 0.93 爲分群依據時可分成三群 (圖 3)，此時每群距離平均爲 1.0；第一群除 PI314817 (VA73)及 Kinorales (VA12) 屬 Valencia 型外，其它品系均爲 Spanish 型，此群包含台南十一號 (SP75)、台南選九號 (SP15)、台南白油豆一號 (SP16)、北港白油豆 (SP48)、台南六號 (SP12)、台南十號 (SP18)、PI314817 (VA73)、台南七號 (SP13)、台南十二號 (SP82)、Spanish small (SP325)、台農四號 (SP22)、Kinorales (VA12)及老公仔豆 (SP46) 等共 13 品系；除老公仔豆爲地方在來種及 Spanish small (SP325) 爲國外引進種外，均分別屬於台南十一號育種系統(圖 1A)、台南七號育種系統(圖 1B)、台南十二號育種系統 (圖 1D) 及台農四號育種系統 (圖 1C)，且此四個育種系統之親本僅 Florispan runner (VB79) 及 Spanish white (SP11) 不在此群中。第二群主要爲本地種及國外引進種中之 Spanish 型(圖 1F, 1G)及台農五號育種系統 (圖 1E)，包括台南白油豆二號 (SP17)、台農三號 (SP21)、金門種花生(SP62)、Imp. sp. 2-B-48-1(SP216)、懷遠種花生 (SP60)、台農二號 (SP20)、台農一號 (SP19)、台農五號 (SP410)、CJ-444 (SP409)、Spanish white (SP11)、Java 2 (SP88)、Chiba bunch (VB45) 及 Florispan runner (VB79)等共 13 品系；其中只有 Chiba bunch (VB45) 及 Florispan runner (VB79) 爲 Virginia bunch 型，其他 11 品系均爲 Spanish 型。第三群則均屬本地種及國外引進種中之 Virginia bunch 及 Virginia runner 型(圖 1F, 1G)，包括鴛鴦豆 (VR20)、大冇 (VR19)、立枝仔 (VB12) 及澎湖二號 (VR17) 等四品系；因此，分成三群時，可呈現出依植物型之 Spanish 型、Valencia 型及 Virginia 型而分群，並且亦可由其次集群呈現出台南七號育種系統、台南十一號育種系統、台南十二號育種系統、台農四號育種系統及台農五號育種系統之育種譜系關係。

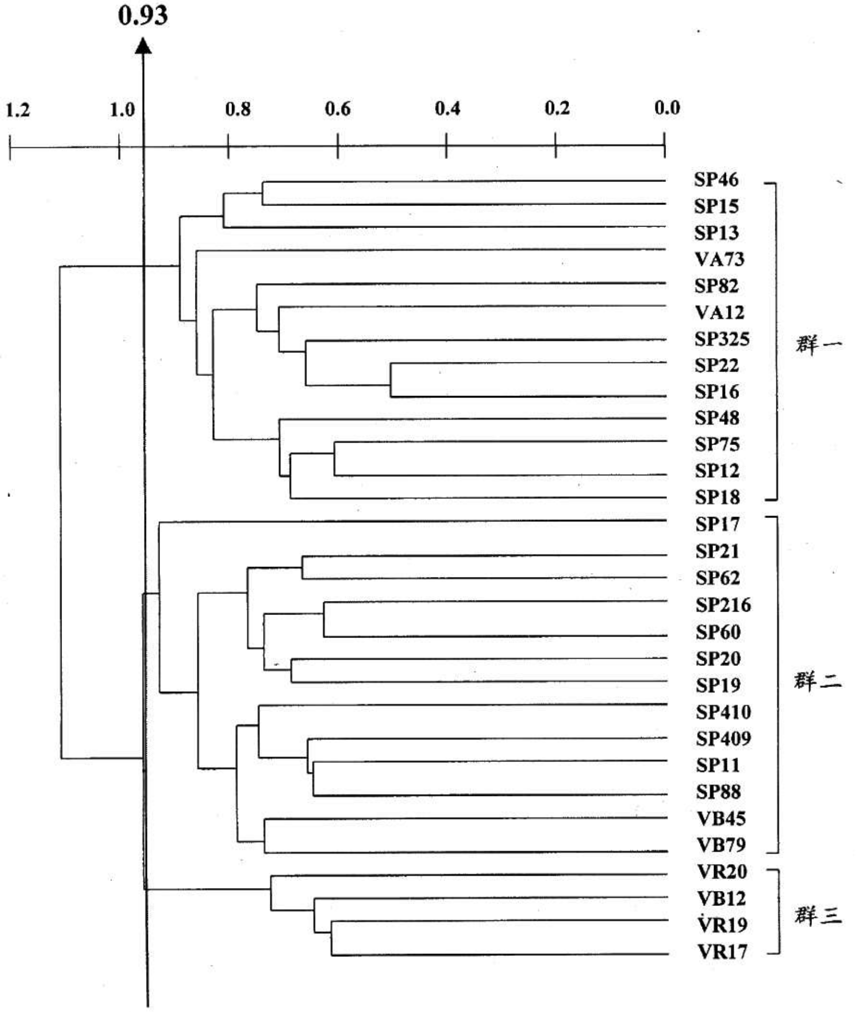


圖 3. 落花生三十個品種(系)綜合十一個引子 (OPB2、OPB14、OPE13、OPG12、OPF15、OPF16、OPF18、OPF19、OPH9、OPH11 及 OPJ17) 以 Dice's 係數計算之歐氏距離為基礎所構築之 RAPD 群集分析樹狀圖。當兩群間最小距離大於 0.93 時，可以歸納成三群。

Fig. 3. RAPD dendrogram of 30 varieties (lines) of *Arachis hypogaea* L. in this study by eleven primers (OPB2、OPB14、OPE 13、OPG12、OPF15、OPF16、OPF18、OPF19、OPH9、OPH11 and OPJ17) and constructed by UPGMA cluster analysis based on the Euclidean distances of Dice's coefficient. When the mini distance (MD) is more than 0.93, these samples can be divided into 3 main clusters.

表 3. RAPD 特定分子片段與植物生長型態之關係

Table 3. The relationship of RAPD marker band and plant botanic type

Primer	Product size	Spanish type	Valencia type	Virginia bunch type	Virginia runner type
OPE13	699bp	+[z]	+	−	−
OPF16	337bp	−	+	+	+
OPJ17	640bp	−	±	+	+

[z] +: band is present; −: band is absent; ±: band may be present or absent depending on different varieties.

依據此樹狀圖另以其兩群間最小距離 (MD)大於 0.83 爲分群依據進一步將其分爲七個族群(圖 4)，此時每群平均距離 0.92，而後 8-29 群每群平均距離爲 0.70，已有部份群間距離小於群內之距離，不需再分群。在分成七群時，第一群爲 Spanish 型之老公仔豆 (SP46)、台南七號 (SP13)及台南選九號 (SP15)；第二群爲 Valencia 型之 PI314817 (VA73)；第三群爲台南十一號育種系統、台農四號育種系統、台南十二號及國外引進種 Spanish small (SP325)共 9 品系，包括台南十二號(SP82)、Spanish small (SP325)、台農四號 (SP22)、Kinorales (VA12) 、台南白油豆一號(SP16)、北港白油豆(SP48)、台南十一號(SP75)、台南六號(SP12)及台南十號(SP18)；第四群均爲本地種之 Virginia 型 4 品系，包括鴛鴦豆(VR20)、大冇

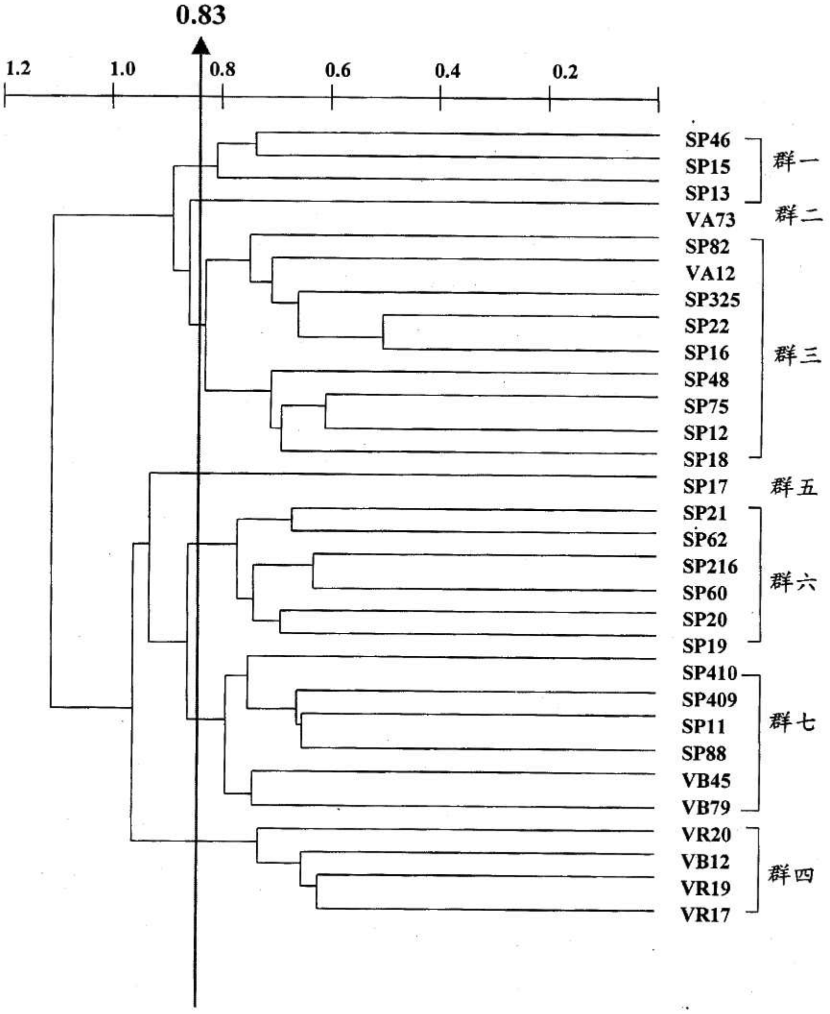


圖 4. 落花生三十個品種(系)綜合十一個引子 (OPB2、OPB14、OPE13、OPG12、OPF15、OPF16、OPF18、OPF19、OPH9、OPH11 及 OPJ17) 以 Dice's 係數計算之歐氏距離爲基礎所構築之 RAPD 群集分析樹狀圖。當兩群間最小距離大於 0.83 時，可以歸納成七群。

Fig. 4. RAPD dendrogram of 30 varieties (lines) of *Arachis hypogaea* L. in this study by eleven primers (OPB2、OPB14、OPE13、OPG12、OPF15、OPF16、OPF18、OPF19、OPH9、OPH11 and OPJ17) and constructed by UPGMA cluster analysis based on the Euclidean distances of Dice's coefficient. When the mini distance (MD) is more than 0.83, these samples can be divided into 7 main clusters.

(VR19)、立枝仔(VB12)及澎湖二號(VR17)；第五群爲本地種中 Spanish 型之台南白油豆二號 (SP17)；第六群包括台農三號(SP21)、金門種花生(SP62)、Imp. sp. 2-B-48-1(SP216)、懷遠種花生(SP60)、台農二號(SP20)及台農一號(SP19) 共 6 品系，均爲本地種及國外引進種中之 Spanish 型；第七群爲台農五號(SP410)、CJ-444 (SP409)、Spanish white (SP11)、Java 2 (SP88)、Chiba bunch (VB45)等均屬台農五號育種系統及 Florispan runner (VB79) 共 6 品系。其中只有 Chiba bunch (VB45)及 Florispan runner (VB79)爲 Virginia bunch 型，其他 4 品系均爲 Spanish 型。由此顯示，當分成七群時可更進一步明顯劃分出台南十一號育種系統(群三)、台農四號育種系統(群三)及臺農五號育種系統(群七)之育種譜系關係(圖 1)，並可將本地種及國外引進種中與此五個育種譜系無關者之 Spanish 型及 Virginia 型清楚分群(群四、群五及群六)。由此結果可以清晰得知台南七號育種系統、台南十一號育種系統、台南十二號育種系統、台農四號育種系統及臺農五號育種系統之譜系關係，與由 RAPD 所得資料經集群分析結果之分群結果相當一致，並與植物型分類結果相符合。依上述結果推論，落花生種原若使用本試驗所得之引子進行親緣關係之探討，應屬可行。

表 4. 落花生三十品種(系)之 RAPD 圖譜經集群分析後之標準偏差、複相關係數及兩群間最小距離的三種統計値表
Table 4. The table of 3 statistical values, including RMSSTD, RSQ and MD (norm), is calculated by cluster analysis of RAPD profiles of 30 peanut varieties (lines)

群　　數 No. of cluster	所有變數之標準偏差 RMSSTD	複相關係數 RSQ	兩群間最小距離 MD(norm)
29	0.006351	0.99110	0.508068
28	0.07644	0.97820	0.611539
27	0.07879	0.96450	0.630378
26	0.07966	0.95049	0.637304
25	0.07686	0.93332	0.661941
24	0.08169	0.91756	0.664883
23	0.08333	0.90223	0.666634
22	0.08372	0.88662	0.671369
21	0.08472	0.87078	0.677808
20	0.08270	0.85348	0.685331
19	0.08792	0.83642	0.703414
18	0.08555	0.81816	0.706429
17	0.08301	0.79861	0.709908
16	0.08714	0.77779	0.738187
15	0.09252	0.75889	0.740204
14	0.09037	0.73588	0.747600
13	0.08739	0.71409	0.748601
12	0.09376	0.69469	0.750128
11	0.08964	0.67242	0.761580
10	0.09396	0.64491	0.781074
9	0.09543	0.61701	0.798073
8	0.09950	0.59221	0.822488
7	0.09618	0.54475	0.825133
6	0.10180	0.49106	0.858965
5	0.09859	0.46134	0.861439
4	0.10352	0.41428	0.887038
3	0.10413	0.37874	0.928569
2	0.10960	0.29197	0.955983
1	0.12499	0.00000	1.119413

討　論

本試驗所使用之三十個品種(系)落花生，均屬栽培種落花生，依其育種譜系關係可分成七組(圖 1)。栽培種落花生可分成二亞種，即 *Arachis hypogaea* spp. *hypogaea* 及 *A. hypogaea* spp. *fastigiata*，而每一亞種又可分爲二植物學上之變種，且依其植物型態，共可分成 Spanish、Valencia、Virginia bunch、Virginia runner 等四型，亦有人將 Virginia bunch 及 Virginia runner 二型合稱爲 Virginia 型；其型間在植株、莢果及種子性狀上皆有明顯不同。其中以 Virginia bunch 型及 Virginia runner 型(同屬於 *A. hypogaea* ssp. *hypogaea* var. *hypogaea*)最爲相近。爲匍匐型，主軸上無花序。Spanish 型(*A. hypogaea* ssp. *fastigiata* var. *vulgaris* Harz.)與 Valencia 型(*A. hypogaea* ssp. *fastigiata* var. *fastigiata*)有部份性狀相似，爲直立型，主軸上有花序，而 Spanish 型與 Virginia 型 (Virginia runner 及 Virginia bunch)差距最大。Gregory 等人[15]於 1980 年的研究報告中曾將落花生各亞種依其變異中心之地理區域加以分類，其中 *A. hypogaea* ssp. *hypogaea* var. *hypogaea* 多分佈於 Bolivian 及 Amazonia，屬 Virginia 型；*A. hypogaea* ssp. *fastigiata* var. *fastigiata* 分佈於 Guaranian，Goias， Minas Gerais，Peruvian 及 Northeast Brazil，除 Peruvian 外均爲 Valencia 型；而 *A. hypogaea* ssp. *fastigiata* var. *vulgaris* Harz. 屬 Spanish 型則多聚集於 Guaranian，Goias，Minas Gerais 及 Northeast Brazil。因此，Virginia 型、Valencia 型和 Spanish 型等三型的起源和落花生在南美洲原產地的變異中心之地理區域分佈極爲符合，並與植物型極爲相符。本試驗結果所產生具有與植物形態判別有關之標誌條帶共有三個條帶(表 3)，其中引子 OPE13 所產生之 699 bp 條帶，可爲區分 Virginia 型與 Spanish 型、Valencia 型之標誌條帶；另外，引子 OPF16 所產生之 337 bp 之條帶可區分出 Spanish 型與 Valencia 型、Virginia 型，而引子 OPJ17 所產生之 640 bp 條帶，可做爲 Spanish 型與 Valencia 型、Virginia 型之植物型態分群時之輔助標誌。因此，綜合此三條標誌條帶可清楚分別鑑別出 Virginia (含 Virginia bunch 及 Virginia runner)、Valencia 及 Spanish 等三型；其中 Spanish 型與 Virginia runner 型及 Virginia bunch 型屬不同之亞種。本試驗中 337 bp、640 bp 及 699 bp 等三個條帶均可爲此二植物型區分之標誌條帶。Spanish 型與 Valencia 型屬同一亞種之不同變種，本試驗中亦只有 337 bp 之標誌條帶可用以區分此二植物型。另外，Virginia runner 型及 Virginia bunch 型則屬於同一亞種之相同變種，其親緣關係更爲相近，因此，本試驗仍無法以此三條標誌條帶區分出同屬一個變種之 Virginia bunch 及 Virginia runner 型。且由此標誌條帶之結果可見 Spanish 型與 Valencia 型之遺傳距離應較 Virginia 型相近，此與植株生長型態異同及親源關係極爲符合，亦與原產地變異中心之地理區域分佈型態相符合。

Halward 等人[16,17]曾以 RAPD 技術進行栽培種落花生(*A. hypogaea*)之鑑別，並沒有得到多型性之條帶，可能因其只用 16 個引子進行篩選，尚不足以篩選出多型性條帶。1997 年 He 等人[21]亦曾利用 DAF (DNA amplification fingerprinting)方法進行栽培種落花生之鑑別，共篩選了 550 條引子，只有 17 個引子具多型性，只佔總引子數之 3%。而 He 等人[22]於 1995 年同樣以 DAF 技術進行甘藷之測試發現，所篩選之引子超過 50%具有多型性。因此，栽培種落花生之遺傳變異度與其他作物相較之下顯然低了許多。而其他學者對落花生之研究亦得到相似之結果[18,20,27,37]，顯示栽培種落花生種內基因組的 DNA 之變異不大。另外，He 等人[21]曾利用 AFLP 方式篩選栽培種落花生種內之多型性片段，發現篩選的 64 個引子中有 43% (28 條)之引子具多型性，雖較 DAF 之結果高了許多，然而 AFLP 相對須耗費較高的人力、時間、財力及技術等資源。本試驗中應用 RAPD 所得之結果，篩選 200 個引子，共產生 2,133 個條帶，其中僅獲得 11 個引子具有明顯多型性，由此 11 個多型性引子所產生之 212 個條帶，僅佔總條帶數之 9.9%，具多型性引子佔總引子數之比率爲 5.5%，較 He 等人[21]以 DAF 試驗結果所產生具多型性引子比率數 3%略高一些，顯示以 RAPD 方法可做爲栽培種落花生之種內鑑別工具，但必須進行大量引子分析篩選，方可獲得較多的多型性。

就具有多型性之 RAPD 膠片進行分析，可得到部份與遺傳特性有關之訊息，如：根據三個標誌條

帶歸納之結果可作爲落花生三個生長型態 (Spanish 型、Valencia 型及 Virginia 型)之鑑別標誌條帶。且根據 OPJ17 引子之 RAPD 電泳結果，PI314817 (VA73)與 Kinorales (VA12) 雖同屬於 Valencia 型，但 PI314817 (VA73)具 640 bp 之條帶，而 Kinorales (VA12)於 640 bp 處沒有條帶出現，因而引子 OPJ17 可能可作爲 Valencia 型內之鑑別引子。然而本試驗中 Valencia 型之品種(系)只有兩個，因而有待進一步以更多之 Valencia 品種(系)確認。CJ-444 (SP409) 之親本爲 Chiba bunch (VB45)及 Java2 (SP88)，分別屬於 Virginia 型及 Spanish 型，根據本試驗報告第一部份中綜合兩年之農藝性狀調查資料顯示，CJ-444 (SP409) 之株高、成熟莢數、成熟莢重、粒寬、成熟粒數、成熟粒重、剝實率、莢產量、籽粒產量、百莢重及千粒重等性狀與 Virginia 型之平均值較相近；而只有分枝數、莢長、莢寬、粒長、花型、飽滿度及成熟日數等性狀與Spanish 型之平均值相近(范等，1999)。且本試驗RAPD結果可發現，CJ-444 (SP409)於引子 OPE13 之 699 bp 處及引子 OPJ17 之 640 bp 處條帶之出現與否均與 Virginia 型具相同之結果，而與 Spanish 型則不相同，顯示 CJ-444 (SP409) 之遺傳型態較偏向其親本 Chiba bunch (VB45)，故與 Spanish 型之結果不同。此種由二不同亞種雜交後代選出之品系，其依植物分類雖歸屬於 Spanish 型，但仍具有很多種偏向於Virginia 型之農藝性狀，且由DNA 之分析結果，其多型性出現偏向另一親本，顯示由RAPD 之結果對遺傳背景之分析比農藝性狀可得較多之訊息。另外，此種由二不同亞種雜交後代選育品種，因具有二不同亞種之血緣，勢必對由外觀進行植物型分類之結果產生若干疑問，此種由人爲外力介入而產生遺傳演化上之異常，可能需以農藝性狀及RAPD 之結果互相比對，再加以討論才能獲得合理之解釋。

由 11 個具明顯多型性引子之 RAPD 電泳結果共得 212 條帶，將此資料以綜合集群分析之結果分成三群時，已可呈現出依植物型而分群之關係，其中群一及群二爲 Spanish 型及 Valencia 型，群三爲本地種及國外引進種中與本試驗所用之育種系統無關之 Virginia 型。且分成三群時，亦可看出五個育種系統之相關品種(系)已然聚集於各次族群下。若將綜合集群分析之結果，分成七群時，則可更清晰呈現出台南十一號育種系統(群三)、台農四號育種系統(群三)、及台農五號育種系統(群七)之育種譜系關係(圖 1)，甚而，本地種及國外引進種中與此五個育種系統無關之樣品，亦可明顯依 Virginia 型及 Spanish 型之植物型而分群(群四、群五及群六)。然而，在分成七群時，台南七號 (SP13) 與其親本台南白油豆一號 (SP16)被分成不同之兩群，可能係育種選拔過程之人爲選育導致其遺傳組態偏向Java 12 號之親本，而此親本在本試驗中並未選用，因而無法加以確認之。台南十二號(SP82) 亦與其親本台南選九號(SP15)及 PI314817 (VA73)分於不同集群中，可能亦是育種選拔過程之人爲選育導致其遺傳組態偏向其他之親本，且根據台南十二號育種系統之譜系圖可發現其母本中有 Florigiant (屬於 Virginia runner 型)，而父本中有 Valencia 型 (VA73)，此種 Spanish 型、Valencia 型及 Virginia 型之型間雜交，可能亦是導致其與親本之遺傳組成偏離之因。

臺農四號親本爲 Spanish White (SP11) 及 Kinorales (VA12)，但以 RAPD 結果中具多型性及有標誌條帶之 11 個引子所獲得之結果進行綜合集群分析後顯示，台農四號與 Kinorales (VA12)之距離較近 (0.75)，而與 Spanish white (SP11)距離較遠(1.12)，且在 OPF16、OPE13 及 OPJ17 三條引子之群集分析亦有類似之結果，可能亦屬選育過程中使其特性偏向Kinorales (VA12)之故，且Spanish white (SP11) 也是台農五號 (SP410)之親本，此二品系之遺傳組態較爲相近，當進行集群分析時，Spanish white (SP11) 則受到台農五號(SP410)之影響而聚集於群七之台農五號育種系統之集群內。

根據育種資料顯示台南白油豆一號 (SP16)爲北港白油豆 (SP48)所選拔出之品種，台農三號(SP21) 由Imp. sp. 2-B-48-1(SP216)所選拔出，台農一號(SP19)則由懷遠花生(SP60)所選拔出，澎湖二號 (VR17) 是由鴛鴦豆(VR20)純系所選拔出，台農二號(SP20)由金門種花生(SP62) 純系所選拔出等，而在 RAPD 綜合集群分析結果顯示台南白油豆一號與北港白油豆、台農三號與Imp. sp. 2-B-48-1、台農一號與懷遠花生、澎湖二號與鴛鴦豆及台農二號與金門種花生彼此間之歐氏距離分別爲 0.83、0.78、0.75、0.74 及

0.78，均相當近，且均在相同之次族群下(圖 3、4)。因此，由本試驗 RAPD 之集群分析結果亦可極清楚看出純系選拔之親緣關係。

根據本試驗報告第一部份綜合兩年之農藝性狀調查資料所進行之集群分析結果顯示(2)，利用農藝性狀進行親緣關係之鑑定，可能會產生分群上之部份偏差出現。根據農藝性狀調查資料所進行之集群分析結果 ，雖可呈現出 Virginia 型與 Spanish 型之植物型分群關係，但不能很清楚呈現地方種及外來引進種之選拔育種關係；綜合上述可知，農藝性狀可對植物型及育種關係進行初步之判別，然而，耗費時間較長；而 RAPD 之結果則不但可清楚植物型之差異性及育種選拔之關係，亦可鑑別育種譜系親緣關係之遠近，故依此結果推論，落花生種原若使用本試驗所得之引子進行親緣關係之確認，應屬相當可行，其結果可做爲育種時親本選擇之參考用。

誌　謝

本研究承蒙行政院農業委員會補助經費 (85 科技-1.5-糧-01)，試驗期間承國立臺灣大學農藝學系沈明來教授提供相關的統計分析指導及曾美倉教授與張德慈博士之斧正，特此誌謝。

引用文獻

1. 沈明來。 1998。 實用多變數分析， 381-486 頁。九州圖書文物有限公司，台灣，台北。
2. 范明仁、許庭榮、王昭月、曹文隆、楊金興、鄭耀星。1999。台灣落花生種原之親緣關係 II 應用農藝性狀進行落花生種原親緣關係之研究。中華農學會報（刊印中）。
3. 黃明得。1994。雜糧作物各論 (二)，第 13 章 落花生， 1043-1152 頁。豐年社，台灣，台北。
4. 楊金興、 曹文隆、鄭耀星、 黃惠娟、 盧煌勝。 1996 。落花生新品種台農六號之育成。 中華農業研究 45: 113-127。
5. 農情報導。 1998。113:3。臺灣省政府農林廳編印，台灣，南投。
6. Asakura, N., C. Nakamura, and I. Ohtsuka. 1997. RAPD markers linked to the nuclear gene from *Triticum timopheevii* that confers compatibility with *Aegilops aquarrosa* cytoplasm on alloplasmic durum wheat. Genome. 40: 201-210.
7. Blok, V. C., M. S. Phillips, and B. E. Harrower. 1997. Comparison of British populations potato cyst nematodes with populations from continental Europe and South America using RAPDs. Genome. 40: 286-293.
8. Botstein, D., R. L. White, M. Skolmick, and R. W. Davis. 1980. Construction of genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. Am. J. Hum. Genet. 32:314-331.
9. Brown, P. T. H., F. D. Lange, E. Kranz, and H. Loerz. 1993. Analysis of single protoplasts and regenerated plants by PCR and RAPD technology. Mol. Gen. Genet. 237:311-317.
10. Demeke, K., D. R. Lynch, L. M. Kawchuk, G. C. Kozub, and J. D. Armstrong. 1996. Genetic diversity of potato determined by random amplified polymorphic DNA analysis. Plant Cell Rep. 15: 662-667.
11. Demeke, T., R. P. Adams, and R. Chibbar. 1992. Potential taxonomic use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) : a case study in *Brassica.* Theor. Appl. Genet. 84: 990-994.
12. Delourme, R., A. Bouchereau, N. Hubert, and M. Renard. 1994. Identification of RAPD markers linked to a fertility restorer gene for the Ogura radish cytoplasmic male sterillity of rapeseed *(Brassica napus* L.). Theor. Appl. Genet. 88:741-748.
13. Garcia, G. M., H. T. Stalker, and G. Kochert. 1995. Introgression analysis of an interspecific hybrid population in peanuts (*Arachis hypogaea* L.)using RFLP and RAPD makers. Genome. 38:166-176.
14. Garcia, G. M., H. T. Stalker, E. Shroeder, and G. Kochert. 1996. Identification of RAPD, SCAR, and RFLP markers tightly linked to nematode resistance genes introgressed from *Arachis cardenasii* into *Arachis hypogaea.* Genome. 39:836-845.
15. Gregory, W. C., A. Krapovickas, and M. P. Gregory. 1980. Structure, variation, evolution and classification in *Arachis.* pp. 469-481. In: Summerfield, R. J., and A. H. Bunting eds. Advances in legume science. Royal Botanic Gardens, Kew, UK.
16. Halward, T. M., H. T. Stalker, E. A. LaRue, and G. Kochert. 1991. Genetic variation detectable with molecular markers among unadapted germplasm resources of cultivated peanut and related wild species. Genome. 34:1013-1020.
17. Halward, T. M., H. T. Stalker, E. A. LaRue, and G. Kochert. 1992. Use of single-primer DNA amplifications in genetic studies

of peanut (*Archis hypogaea* L.) Plant Mol. Bio. 18:315-325.

18. Halward, T. M., H. T. Stalker, and G. Kochert. 1993. Development of an RFLP linkage map in diploid peanut species. Theor. Appl. Genet. 87:379-384.
19. Hamrick, J. L., and R. W. Allard. 1975. Correlation between quantitative characters and enzyme genotypes in *Avena barbata*. Evolution 29 :438-443.
20. He, G., A. K. Singh, and C. S. Prakash. 1997. Analysis of genetic relationships among accessions of *Arachis stenosperma* and *A. duranensis* using DNA markers. Plant Genetic Resources Newsletter 111:25-28.
21. He, G., and C. S. Prakash. 1997. Identification of polymorphic DNA markers in cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.) Euphytica. 97:143-149.
22. He, G. C. S. Prakash., and R. L. Jarret. 1995. Analysis of genetic diversity in a sweetpotato (*Ipomoea batatas*) germplasm collection using DNA amplification fingerprinting. Genome. 38:938-945.
23. Heusden, A. W. van, and D. Haalman. 1992. Genotype relationships in *Microseris elegans (Asteraceae, Lactuceae)* revealed by DNA amplification from arbitrary primers (RAPDs). P1. Syst. Evol. 179:221-233.
24. Isabel, N., L. Tremblay, M. Michaud, F. M. Tremblay, and J. Bousquet. 1993. RAPDs as an aid to evaluate the genetic integrity of somatic embryogenesis derived populations of *Pricea mariana* (Mill.) B. S. P.. Theor. Appl. Genet. 86:81-87.
25. Jian, C., and K. C. Sink. 1997. RAPD and SCAR markers linked to the sex expression locus M in asparagus. Euphytica. 94: 329-333.
26. Jain, S. K., C. O. Qualset, G. M. Bhatd, and K. K. Wu. 1975. Geographical patterns of phenotypic diversity in a world collection of durum wheat. Crop. Sci. 15:700-704.
27. Kochert, G. D., T. M. Halward, W. D. Branch, and C. E. Simpson. 1991. RFLP variability in peanut (*Arachis hypogaea* L.) cultivars and wild species. Theor. Appl. Genet. 81:565-570.
28. Lin, C. S., and Binns, M. R. 1984. The precision of cultivar trails within eastern cooperative tests. Can. J. Plant Sci. 64:587-591.
29. Link, W., C. Dixkens, M. Singh, M. Schwall, and A. E. Melchinger. 1995. Genetic diversity in European and Mediterranean faba bean germplasm revealed by RAPD markers. Theor. Appl. Genet. 90:27-32.
30. Lu, J., and B. Pickersgill. 1993. Isozyme variation and species relationships in peanut and its wild relatives (*Arachis* L. Leguminosae). Theor. Appl. Genet. 85:550-560.
31. Martin, G. B., J. G. K. Williams, and S. D. Tanksley. 1991. Rapid identification of markers linked to a *Pseudomonas* resistan ce gene in tomato by using random primers and near-isogenic lines. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 2336-2340.
32. Mikkelsen, T. R., J. Jensen, and R. B. Jorgensen. 1996. Inheritance of oilseed rape (*Brassica napus)* RAPD markers in back-cross progency with *Brassica* campestris. Theor. Appl. Genet. 92: 492-497
33. Millan, T., F. Osuna, S. Cobos, A. M. Torres, and J. I. Cubero. 1996. Using RAPDs to study phylogenetic relationships in *Rosa*. Theor. Appl. Genet. 92:273-277.
34. Mumm, R. H., and J. W. Dudley. 1995. A PC SAS computer program to generate a dissimilarity matrix for cluster analysis. Crop. Sci. 35: 925-927.
35. Oard,J. H., and Dronavalli. 1992. Rapid isolation of rice and maize DNA for analysis by random-primer PCR. Plant Mol. Bio. Rep. 10:236-241.
36. Orozco-Castillo, C., K. J. Chalmers, R. Waugh, and W. Powell. 1994. Detection of genetic diversity and selective gene introgression in coffee using RAPD markers. Theor. Appl. Genet. 87:934-940.
37. Paik-Rao, O. G., R. L. Smith, and D. A. Knauft.1992. Restriction fragment length polymorphism evaluation of 6 peanut species within the *Arachis* section. Theor. Appl. Genet. 84:201-208.
38. Parani, M., M. Lakshmi, S. Elango, N. Ram, C. S. Anuratha, and A. Parida. 1997. Molecular phytogency of mangroves II. Intra- and inter-specific variation in *Avicennia* revealed by RAPD and RFLP markers. Genome. 40: 487-495.
39. Singh, A. K., S. Gurtu, and R. Jambunathan. 1994. Phylogenetic relationships in genus *Arachis* based on protein profiles. Euphytica. 74:219-225.
40. Stalker, H. T., T. D. Phillips, J. P. Murphy, and T. M. Jones. 1994. Variation of isozyme pattern among *Arachis* Species. Theor. Appl. Genet. 87:746-755.
41. Stiles, J. I., C. Lemme, S. Sondur, M. B. Morshidi, and R. Manshardt. 1993. Using randomly amplified polymorphic DNA for evaluating genetic relationships among papaya cultivars. Theor. Appl. Genet. 85:697-701.

42. Swoboda, I., and P. L. Bhalla. 1997. RAPD analysis of genetic variation in the Australian fan flower, *Scaevola*. Genome. 40: 600-606.

43. Thormann, C. E., M. E. Ferreira, L. E. A. Camargo, J. G. Tivang, and T. C. Osborn. 1994. Comparison of RFLP and RAPD markers to estimating genetic relationships within and among cruciferous species. Theor. Appl. Genet. 88:973-980.

44. Tivang, J., P. W. Skrocg, and J. Nienhuis. 1996. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) variation among and within Artichoke (*Cynara scolymus* L.) cultivars and breeding population. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 12:783-788.

45. Vos. P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. V. D. Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper, and M. Zabeau. 1995. AFLP:a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids. Res. 23(21):4427-4414.

46. Welsh, J., and M. McClelland. 1991.Genomic fingerprinting using arbitrarily primer PCR and a matrix of pairwise combinations of primers. Nucleic Acid Res. 19:5275-5279.

47. Wilkie,S. E., P. G. Isaac, and R. J. Slater. 1993. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for genetic analysis in *Allium*. Theor. Appl. Genet. 86:497-504.

48. Xiao, J., J. Li, L. Yuan, S. R. McCouch, and S. D. Tanksley. 1996. Genetic diversity and its relationship to hybrid performance and heterosis in rice as revealed by PCR-based markers. Theor. Appl. Genet. 92:637-643.

49. Yang, X., and C. Quiros. 1993. Identification and classification of celery cultivars with RAPD markers. Theor. Appl. Genet. 86:205-212.

50. Yu, L. X., and H. T. Nguyen. 1994. Genetic variation detected with RAPD markers among upland and lowland rice cultivars (*Oryza sativa* L.). Theor. Appl. Genet. 87:668-672.

Studies on the Genetic Relationship of Peanut Germplasm in Taiwan

Ⅱ. Studies on the Genetic Relationship of Peanut Using Random Amplified Polymorphic DNA Analysis [1]

Ming-Jen Fan [2], Shuen-Fang Lo [2], Jau-Yueh Wang [2], Ting-Rong Shu [2], Wen-Long Tsaus [3], Kin-Hsing Yang [3] and Yan-Sin Cheng [4]

Summary

This experiment was conducted by using randomly amplified polymorphic DNA marker (RAPD marker) analysis to evaluate the genetic relationship of peanut germplasm. There are totally 30 varieties (lines), which were frequently supplied as the source of peanuts and main bred varieties (lines) in breeding program in Taiwan were analyzed. The results of RAPD were compared with the agricultural traits. The correlation coefficient get from RAPD can be used as the index to select the varieties (lines) for breeding program to increase the genetic gains. This method also can be developed as a protocol for identification of peanut germplasm. There were totally 200 operon decamer primers was used to screen the polymorphism response, only 11 primers (5.5%) show positive and produced 212 reproducible and effective bands. Three identical bands produced by OPE13, OPF16 and OPJ17 at 699 bp, 337 bp and 640 bp respectively can be look as marker bands for botanical type identification. In this way three botanical type of Spanish type, Valencia type and Virginia type can be distinguish by three marker bands. The RAPD profiles of 11 polymorphic primers were converted into the matrix for Euclidean distances based on Dice's coefficient to proceed with the cluster analysis by UPGMA (Unweighted Pair-Grouping Mean Arithmetical). The numbers of cluster are based on the MD, RSQ and RMSSTD obtained from cluster analysis. The 30 varieties (lines) could be divided into 7 main clusters when the Euclidean distances were greater than 0.83. The first cluster contained 3 varieties of Spanish type named Lau-Kung-Tzu-Tou, Tainan No. 7 and Tainan selected No. 9. The second cluster only has one variety PI314817 (Valencia type). The third cluster contained 9 varieties, which also belong to the breeding systems of Tainan No.11,Tainung No.

1. Contribution No. 1976 from Taiwan Agricultural Research Institute.

2. Respectively, Research Fellow and Head, Engaged Technician, Assistant Agronomist, National Plant Genetic Resources Center, TARI, Wufeng, Taichung, Taiwan, ROC.

3. Respectively, Assistant Agronomist, Department of Agronomy, TARI, Wufeng, Taichung, Taiwan, ROC.

4. Senior Specialist, Council of Agriculture, Executive Yuan Taipei City, ROC.

4 and Tainan No. 12. The fourth cluster contained 4 native varieties of Virginia type which were not used in the breeding programs. The fifth cluster signally contained Tainan white oil bean No.2, which is a native Spanish type variety. The sixth cluster contained 6 native varieties of Spanish type and selected from introduced varieties. The Seventh cluster contained 6 varieties which were used in Tainung No.5's breeding program and Florispan runner. According to the result of cluster analysis of RAPD significantly revealed the pedigree diagrams of the breeding programs of Tainan No.11, Tainung No.4 and Tainung No.5, and also closely related to plant botanical types. The results could be deducted that 11 selected primers in this study can be effectively and reliably used for studies of genetic distances and the genetic relationship of peanut germplasm.

Key words: Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD), Cluster analysis, Peanut.